



Universidade Federal do Maranhão  
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde



Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

**Doutorado**

**AVALIAÇÃO DO ÓLEO DE PEIXE RICO EM OMEGA-3 EM  
INFECÇÕES CAUSADAS POR *Escherichia coli*  
ENTEROAGREGATIVA 042**

THALITA DE ALBUQUERQUE VÉRAS CÂMARA

São Luís

2022

THALITA DE ALBUQUERQUE VÉRAS CÂMARA

**AVALIAÇÃO DO ÓLEO DE PEIXE RICO EM OMEGA-3 EM  
INFECÇÕES CAUSADAS POR *Escherichia coli*  
ENTEROAGREGATIVA 042**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Maranhão, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde.

Linha de Pesquisa: Investigação Clínica e Laboratorial de Doenças Infecciosas e Parasitárias

Orientador: Prof. Dr. Afonso Gomes Abreu Junior.

São Luís

2022

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo (a) autor (a).  
Núcleo Integrado de Bibliotecas/UFMA

CÂMARA, THALITA DE ALBUQUERQUE VÉRAS.

AVALIAÇÃO DO ÓLEO DE PEIXE RICO EM OMEGA-3 EM INFECÇÕES CAUSADAS POR *Escherichia coli* ENTEROAGREGATIVA 042 / THALITA DE ALBUQUERQUE VÉRAS CÂMARA. - 2022. 78 f.

Orientador (a): AFONSO GOMES ABREU JUNIOR.

Tese (Doutorado) - Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde/CCBS, Universidade Federal do Maranhão, SÃO LUÍS, 2022.

1. Ácidos Graxos Poli-insaturados n-3. 2. *Escherichia coli*. enteroagregativa.  
3. Integridade Intestinal. I. ABREU JÚNIOR, AFONSO GOMES. II. Título.

THALITA DE ALBUQUERQUE VÉRAS CÂMARA

**AVALIAÇÃO DO ÓLEO DE PEIXE RICO EM OMEGA-3 EM  
INFECÇÕES CAUSADAS POR *Escherichia coli*  
ENTEROAGREGATIVA 042**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Maranhão, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde.

Aprovada em / /

BANCA EXAMINADORA

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Hivana Patrícia Melo Barbosa Dall Agnol  
Universidade Federal do Maranhão

---

Prof<sup>º</sup>.Dr<sup>º</sup>. Rafael Cardoso Carvalho  
Universidade Federal do Maranhão

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Adrielle Zagmignan  
Universidade CEUMA

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Poliana Cristina de Almeida Fonseca Viola  
Universidade Federal do Piauí

Á minha avó Wilma Vêras (*in memorian*) e ao meu avô Luiz Carlos Vêras, por todo incentivo, dedicação e amor imensurável.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por direcionar a minha vida e as minhas decisões, principalmente por me manter lutando pelos meus objetivos apesar de todos os obstáculos impostos nesta caminhada.

A minha avó Wilma Vêras (*in memoriam*), minha maior incentivadora e meu grande espelho de mulher guerreira, com certeza foi mais difícil sem você do meu lado, apesar de todas as dificuldades, nunca pensei em desistir, pois não estaria representando a sua força.

Ao meu avô Luiz Carlos Vêras por todo ensinamento de vida, educação, carinho e amor, sou muito agradecida por ser a sua neta, um dos melhores presentes de Deus na minha vida foi ser criada por vocês.

Ao meu filho Théo que nasceu nessa jornada do doutorado e que deu mais combustível para eu vencer mais essa batalha, e ao Júlio César pelo companheirismo.

A toda minha família materna e paterna, e em especial, às minhas duas mães, Nilma Vêras e Telma Vêras, são meu porto seguro; meu padrinho Elismar pelo carinho e apoio; à minha irmã Laurinha, ao meu irmão Henrique, pelas críticas; à minha tia Adriana, por me dá forças e palavras de conforto.

Ao meu orientador, Professor Dr. Afonso Abreu, primeiro por ter me acolhido em um dos momentos mais difíceis da minha vida acadêmica devido problemas de saúde da minha avó, és um humano exemplar, o que conseqüentemente isso reflete na vida profissional. Um professor parceiro e incentivador. Obrigada por toda paciência e dedicação.

A minha equipe de experimento: em especial Savanna e Maria Clara, por não me deixarem em nenhum momento, que acreditaram e me impulsionaram quando nem mesma sabia que poderia me doar mais, meu sincero obrigada, sem vocês esta etapa não seria cumprida de forma alguma. À Marcos, Beatriz, Arthirson, Rômulo, Raissa e Lorena por toda ajuda.

Aos amigos, Wiviane e Alexsandro, pelo apoio e palavras de incentivo sempre.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (PPGCS), em especial ao corpo auxiliar: a secretária do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade

Federal do Maranhão, Sra. Ana Lúcia Cordeiro, sem a qual não teria atenção aos prazos, a demanda acadêmica: meu muito obrigado. E, a Sra. Fátima, auxiliando nos assuntos administrativos do programa, também imprescindível para obtenção do Título.

A Universidade CEUMA de forma geral por me acolher.

A Faculdade Santa Terezinha (CEST) pela parceria, em especial, ao Curso de Nutrição, em nome do qual cito a sua Coordenadora, Mãe, Amiga, Maria Tereza Medeiros Aureliano de Lima, por sempre que possível adequar os meus horários de trabalho para eu finalizar o meu doutorado, além do apoio e grande incentivo, a gente briga, chora mais se ama,

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS .....</b>	<b>II</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>IV</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>V</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>VI</b>
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>13</b>
<b>2 REFERENCIAL TEÓRICO .....</b>	<b>15</b>
<b>2.1 Microbiota intestinal e a sua formação.....</b>	<b>15</b>
<b>2.2 Funções da microbiota normal.....</b>	<b>17</b>
2.2.1 Função nutricional .....	17
2.2.2 Funções antibacterianas, resistência a colonização e proteção.....	18
2.2.3 Função imunomoduladora .....	19
<b>2.3 Disbiose e integridade intestinal.....</b>	<b>20</b>
<b>2.4 <i>Escherichia coli</i> .....</b>	<b>24</b>
<b>2.5 Saúde Intestinal e Alimentação .....</b>	<b>27</b>
<b>2.6 Ácidos graxos poli-insaturados e fontes alimentares .....</b>	<b>29</b>
<b>2.7 Mecanismos de ação dos ácidos poli-insaturados .....</b>	<b>31</b>
<b>3 OBJETIVOS .....</b>	<b>35</b>
<b>3.1 Objetivo Geral .....</b>	<b>35</b>
<b>3.2 Objetivos Específicos.....</b>	<b>35</b>
<b>4 RESULTADOS .....</b>	<b>36</b>
<b>CAPÍTULO I – ARTIGO 1 .....</b>	<b>36</b>
<b>CAPÍTULO II – ARTIGO 2.....</b>	<b>13</b>
<b>5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>13</b>
<b>6 REFERÊNCIAS .....</b>	<b>14</b>
<b>ANEXO A – PARECER DE COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS (CEUA) .....</b>	<b>21</b>
<b>ANEXO B – COMPROVAÇÃO DE SUBMISSÃO DE ARTIGO .....</b>	<b>22</b>



**LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS**

AA	Ácido Araquidônico
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
ALA	Ácido Alfa-Linolênico
AMPc	Adenosina Monofosfato Cíclico
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CIM	Determinação das Concentrações Inibitória Mínima
COXs	Ciclooxigenases
DA	Aderência Difusa
DHA	Docosaenoico
DMEM	<i>Dulbecco Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DO	Densidade Óptica
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EAEC	<i>Escherichia coli</i> Enteroagregativa
EHEC	<i>Escherichia coli</i> Enterohemorrágica
EIEC	<i>Escherichia coli</i> Enteroinvasora
EPA	Ácido Eicosapentaenoico
EPEC	<i>Escherichia coli</i> Enteropatogênica
ERN	Espécies Reativas de Nitrogênio
ERRO	Espécies Reativas de Oxigênio
ETEC	<i>Escherichia coli</i> Enterotoxigênica
H <sub>2</sub> S	Sulfeto de Hidrogênio
HE	Hematoxilina-Eosina
ILF	Folículos Linfoides Isolados
ITU	Infecção do Trato Urinário
LA	Ácido Linoleico
LOXs	Lipooxigenases
LPS	Lipopolissacarídeo
LT	Leucotrienos
MH	Mueller Hinton

NF-KB	Fator Nuclear <i>Kappa</i> B
NK	Células Natural <i>Killer</i>
NOD	<i>Nucleotide-Binding Oligomerization Domain</i>
PAMPS	<i>Pathogenassociated Molecular Patterns</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PG	Prostaglandinas
SIM	Sistema Imunitário das Mucosas
TGI	Trato Gastrintestinal
TH	Linfócitos T <i>Helper</i>
TLR	<i>Toll-Like Receptor</i>
TX	Tromboxanos
UPEC	<i>Escherichia coli</i> Uropatogênica
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
VLDL	Lipoproteína de Muito Baixa Densidade

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** Perfil de distribuição bacteriana ao longo do trato gastrointestinal ..... 16

**Figura 2.** Fatores que influenciam a composição microbiana intestinal e os efeitos da disbiose na saúde do hospedeiro.....21

**Figura 3.** Metabolismo dos ácidos graxos essenciais. TX- Tromboxanos; PG-Prostaglandinas; LT-Leucotrienos. .... 32

## RESUMO

A microbiota intestinal é definida como a população de microrganismos que habita o trato gastrointestinal. Essa população está envolvida em funções cruciais para a homeostasia do hospedeiro, como: digestão, síntese de nutrientes, desenvolvimento do sistema imunitário e barreira contra patógenos. E que o ácido graxo poli-insaturado n-3 possui a habilidade de favorecer a integridade celular do intestino e a manutenção da microbiota benéfica e conseqüente inibir o crescimento de espécies patogênicas. O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade do óleo de peixe rico em ômega-3 sobre infecções causadas por *E. coli* enteroagregativa patogênica 042. Inicialmente foram realizados testes *in vitro* para determinação das concentrações inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) utilizando a técnica de microdiluição em placa. O ensaio de citotoxicidade celular foi realizado para avaliar um possível efeito do óleo de peixe sobre células intestinais HT-29. Para os testes *in vivo*, foram utilizadas larvas *Tenebrio molitor* para avaliação da toxicidade e sobrevivência, bem como camundongos da linhagem *Swiss* para avaliar o efeito do óleo na colonização intestinal por *E. coli* enteroagregativa 042. Assim os animais foram infectados com *E. coli* 042 e em seguida tratados com óleo de peixe durante todo o experimento. Foi realizada a contagem de unidades formadoras de colônia (UFC/g) nas fezes frescas durante 15 dias após infecção dos animais. Além disso, foi realizada a análise histológica do fígado, rim e intestino (cólon) para avaliar possíveis alterações, como: congestão, infiltrado inflamatório e necrose. Os resultados mostraram uma CIM de 25,0 mg/mL e CBM de 100 mg/mL. De acordo com o ensaio de citotoxicidade celular, o óleo de peixe foi tóxico apenas na concentração de 100 mg/mL. No teste *in vivo*, utilizando larvas de *T. molitor*, foi possível observar uma melhora na sobrevivência das larvas tratadas com óleo de peixe. No ensaio de colonização foi observado valores menores de UFC/g por vários dias do experimento no grupo tratado com o óleo em relação ao grupo infectado e sem tratamento, com diferença significativa a partir do 7º dia. Com a análise histológica foi possível observar que nos animais infectados o grau do infiltrado inflamatório foi moderado no intestino e no fígado. Não houve progresso da degeneração hidrópica hepática nos animais do grupo tratados e o perfil do infiltrado inflamatório foi do tipo leve. Desta forma, foi possível mostrar que o óleo de peixe além de não ser tóxico para células HT-29, larvas e camundongos, foi efetivo tanto em manter a sobrevivência de larvas infectadas, como em controlar a colonização intestinal por *E. coli* 042. Adicionalmente, de acordo com os resultados da histologia, favoreceu a integridade de células intestinais, destacando-se como um excelente candidato para controle das infecções intestinais causadas por *E. coli* patogênicas.

**Palavras-chave:** Integridade Intestinal; *Escherichia coli*. enteroagregativa; Ácidos Graxos Poli-insaturados n-3.

## ABSTRACT

The intestinal microbiota is defined as a microorganism population that inhabit the gastrointestinal tract. This population is involved in essential functions for host homeostasis, such as digestion and nutrients synthesis, cell integrity, development of immune system, barrier against pathogens. *Escherichia coli* is a commensal microorganism present in the intestine, however, in the presence of a bacteria population imbalance it can be responsible for causing several pathologies and disorders. The aim of this study was to evaluate the activity of fish oil rich in omega-3 against *Escherichia coli* infections. Initially, *in vitro* tests were performed to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) using a microplate dilution technique. The cell cytotoxicity assay was performed to evaluate a possible effect of fish oil on HT-29 intestinal cells. For *in vivo* tests, *Tenebrio molitor* larvae were used to assess toxicity, as well as Swiss mice to evaluate the oil effect on pathogenic *E. coli* intestinal colonization. In order to evaluate the oil effect on colonization, animals were infected with *E. coli* and treated with fish oil throughout the experiment. Colony-forming units (CFU/g) obtained from fresh feces were counted for 15 days after animal infection. In addition, a histological analysis of the liver, kidney and gut (colon) was performed to assess possible morphological changes, such as: congestion, inflammatory infiltrate and necrosis. The results showed a MIC of 25.0 mg/mL and MBC of 100 mg/mL. In the cell cytotoxicity assay, fish oil was toxic only at a concentration of 100 mg/mL. In the *in vivo* test using *T. molitor* larvae, it was possible to observe an improvement in the survival of the group treated with fish oil. The colonization assay showed lower values of UFC / g for several days of the experiment in the group treated with the oil against the infected and untreated group, with a statistical difference starting on the 7th day. The histological analysis revealed that in the infected animals the predominant degree of the inflammatory infiltrate was moderate in the intestine and only in this group the same process was observed in the liver. There was no progress in hepatic hydropic degeneration in the animals of treatment group and the profile of the inflammatory infiltrate was mild. It was found that fish oil was effective in terms of its bacteriostatic effect, since it controlled *E. coli* colonization and additionally, according to the histology results, it improved the intestinal cells cellular integrity.

**Keywords:** Intestinal Integrity; *Escherichia coli*. enteroaggregative; N-3 Polyunsaturated Fatty Acids.